

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

19/37,DE/24 (Item 24 from file: 351)

009731191 WPI Acc No: 94-011041/02

XRAM Acc No: C94-004516

XPX Acc No: N94-008794

Prepn. of antibody-producing human derived lymphocyte - by immunising an immune deficient animal contg. transplanted human lymphocyte, with antigen, used for prodn. of antibody for cancer treatment

Index Terms: PREPARATION ANTIBODY PRODUCE HUMAN DERIVATIVE LYMPHOCYTE  
IMMUNE IMMUNE DEFICIENT ANIMAL CONTAIN TRANSPLANT HUMAN LYMPHOCYTE  
ANTIGEN PRODUCE ANTIBODY CANCER TREAT

Patent Assignee: (IDEK ) IDEMITSU KOSAN CO LTD

Number of Patents: 001

Number of Countries: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week	Applic No	Date	LA	Pages	IPC
JP 5317084	A	931203	9402	JP 92284052	920928		6	@C12P-021/08 @ (B)

Priority Data (CC No Date): JP 92284052 (920928)

Abstract (Basic): JP 05317084 A

Human lymphocyte is transplanted to an immune deficient animal and grown and then the animal is immunised with a desired antigen to form human-originated lymphocyte producing an antibody against the antigen. Then said lymphocyte is collected. Also claimed is a human monoclonal antibody specific to the extracellular domain of c-erbB2 cancer gene prod..

USE/ADVANTAGE - The monoclonal antibody is useful for the diagnosis and treatment of cancers.

In an example, human monoclonal antibody against KLH was prepd.. Human peripheral blood lymphocyte was transplanted to C.B-17 /Icr-acid mouse abdomen. The lymphocyte was recovered from the immunised mouse and transformed. The obtd. 18 transformants showed productivity of KLH-specific antibody. The transformant was fused with SHM-D33 to establish 13 antiKHL antibody-producing hybridomas. They include 8 IgA, 4 IgG and one IgM. Human monoclonal antibody against AFP and against c-erbB2 cancer gene prod. were also prepd.. Dwg.0/0

Derwent Class: @B04@; @D16@; P31;

Int Pat Class: A61B-010/00; @A61K-039/395@; @C12N-005/20@; @C12N-015/06@; @C12P-021/08@; @G01N-033/574@; @G01N-033/577@; @C12P-021/08@  
@C12R-001-91@

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-317084

(43) 公開日 平成5年(1993)12月3日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 1 2 N 5/20				
15/06				
		7236-4B	C 1 2 N 5/00	B
		8931-4B	15/00	C

審査請求 未請求 請求項の数5(全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-284052	(71) 出願人	000183646 出光興産株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号
(22) 出願日	平成4年(1992)9月28日	(72) 発明者	工藤 俊雄 宮城県仙台市青葉区中山5丁目8番33号
(31) 優先権主張番号	特願平3-311665	(74) 代理人	弁理士 谷川 英次郎
(32) 優先日	平3(1991)10月30日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年8月20日  
日本癌学会発行の「第51回 日本癌学会総会記事」に発表

(54) 【発明の名称】 抗体産生ヒト由来リンパ球及びヒトモノクローナル抗体の製造方法並びに該方法により作製されたヒトモノクローナル抗体

## (57) 【要約】

【目的】 所望の抗原に対する抗体、とりわけ、I g G抗体及びI g A抗体を産生するヒト由来リンパ球を製造する方法並びに該ヒト由来リンパ球を利用してヒトモノクローナル抗体を製造する方法を提供すること並びに該方法により、癌遺伝子産物に特異的なモノクローナル抗体を提供すること。

【構成】 ヒトリンパ球を免疫不全症動物に移植して生着させ、次いで該動物を所望の抗原で免疫し、該抗原に対する抗体を産生するヒト由来リンパ球を生成せしめた後、該リンパ球を採取することから成る抗体産生ヒト由来リンパ球の製造方法を提供した。また、該抗体産生ヒト由来リンパ球を不死化处理し、得られた不死化抗体産生ヒト由来リンパ球をクローン化し、これから前記抗原に対するモノクローナル抗体を採取することから成るヒトモノクローナル抗体の製造方法を提供した。さらに、上記本発明のヒトモノクローナル抗体の製造方法により、c-e r b B 2癌遺伝子産物の細胞外ドメインに対して特異的なモノクローナル抗体を提供した。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトリンパ球を免疫不全症動物に移植して生着させ、次いで該動物を所望の抗原で免疫し、該抗原に対する抗体を産生するヒト由来リンパ球を生成せしめた後、該リンパ球を採取することから成る抗体産生ヒト由来リンパ球の製造方法。

【請求項2】 請求項1記載の方法により製造した抗体産生ヒト由来リンパ球を不活化処理し、得られた不活化抗体産生ヒト由来リンパ球をクローン化し、これから前記抗原に対するモノクローナル抗体を採取することから成るヒトモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項3】 c-e r b B 2 癌遺伝子産物の細胞外ドメインに対して特異的なヒトモノクローナル抗体。

【請求項4】 前記細胞外ドメインはc-e r b B 2 癌遺伝子産物のNo. 495からNo. 509のアミノ酸配列から成る請求項3記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項5】 TKG41株(微工研菌寄第12816号)により生産されるモノクローナル抗体である請求項4記載のヒトモノクローナル抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、抗体産生ヒト由来リンパ球及びヒトモノクローナル抗体の製造方法並びに該方法により作製されるモノクローナル抗体に関する。本発明は各種疾病の診断や治療に有用である。

## 【0002】

【従来の技術】 従来より、抗体を各種疾病の治療や診断の目的でヒトに投与することは広く行なわれている。従来の抗体は主としてマウスのような動物から調製されている。しかしながら、動物由来の抗体を診断、治療の目的でヒトに投与すると、体内で抗抗体が生産されるため、半減期が短く、繰返し投与で高い効果が得られない等の問題があった。この問題を回避するため、人体から直接リンパ球を採取することが考えられるが、目的とする抗原と反応する抗体を産生するヒトリンパ球を採取することは計画的に行なうことができないので、工業的ではない。さらに、所望の抗原でヒトを免疫することは一般的に許されることではないので、目的とする抗体を産生するリンパ球を得ることは困難である。また、仮に人体に抗原を投与できる場合であっても長時間に亘って免疫することはできず、十分な抗体産生を誘起することは困難である。

【0003】 上記問題を解決するため、エプスタイン・バールウイルス(EBV)を用いるトランスフォーム法(D. Kozborら、Methods in Enzymology, 121 140 (1986)やin vitro感作法(C. A. K. Borrebaeckら、J. of Immunology, 136 371 0 (1986))が試みられている。しかし、いずれの

2

方法によっても製造される抗体の多くはIgMである。IgMは精製が困難で安定性が悪い。また、in vitro感作法では、リンパ球を抗原と共に培養するため、感作できる期間が短く、十分な抗体産生を誘起することが困難である。このため、ヒト抗体でも特に抗原に特異的なモノクローナル抗体、とりわけヒトIgGを容易に製造する技術が望まれている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、所望の抗原に対する抗体、とりわけ、IgG抗体を産生するヒト由来リンパ球を製造する方法を提供することである。さらに、本発明の目的は、本発明の方法により製造されたリンパ球を用いてヒトモノクローナル抗体を製造する方法を提供することである。さらに、本発明の目的は、上記本発明の方法により、癌の診断及び治療に有用なヒトモノクローナル抗体を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本願発明者は、鋭意研究の結果、ヒトリンパ球を免疫不全症動物に生着させ、該動物を所望の抗原で免疫し、ヒト由来リンパ球を採取することにより所望の抗原に対する主としてIgG抗体及びIgA抗体を産生するヒト由来リンパ球を得ることができることを見出し本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は、ヒトリンパ球を免疫不全症動物に移植して生着させ、次いで該動物を所望の抗原で免疫し、該抗原に対する抗体を産生するヒト由来リンパ球を生成せしめた後、該リンパ球を採取することから成る抗体産生ヒト由来リンパ球の製造方法を提供する。

【0007】 さらにまた、本発明は、上記本発明の方法により製造した抗体産生ヒト由来リンパ球を不活化処理し、得られた不活化抗体産生ヒト由来リンパ球をクローン化し、これから前記抗原に対するモノクローナル抗体を採取することから成るヒトモノクローナル抗体の製造方法を提供する。

【0008】 さらに本発明は、上記本発明のヒトモノクローナル抗体の製造方法により、c-e r b B 2 癌遺伝子産物の細胞外ドメインに対して特異的なヒトモノクローナル抗体を提供した。

【0009】 本発明で用いる免疫不全症動物は、ヒトリンパ球を移植した時、拒絶反応を起こさない動物である。このような動物は物理的、化学的又は生物学的な処理により人為的に作製し得る。免疫不全症動物は広く知られており、医薬品の研究等で広く用いられている。免疫不全症動物であれば、いずれのものをもち用いることができるが、入手容易性の点からC. B-17/Icr-scidマウス(G. C. Bosmaら、Nature, 301 527 (1983))が好ましい。

【0010】 本発明で用いられるヒトリンパ球は、末梢

血、脾臓、リンパ節、扁桃等由来のものを利用することができる。

【0011】ヒトリンパ球を免疫不全症動物に生着させる方法は、単にヒトリンパ球を該動物に投与することにより行なうことができる。投与経路は皮下、静脈内、腹腔内等、特に限定されない。また、ヒトリンパ球の投与量も特に限定されないが、通常 $10^6$ 個ないし $10^8$ 個程度である。

【0012】次いで、免疫不全症動物を所望の抗原で免疫する。免疫方法自体は、モノクローナル抗体の分野において周知の方法により行なうことができ、例えば「富山朔二・安東民衛編「単クローン抗体実験マニュアル 講談社サイエンティフィック(1987)」に記載された方法を用いることができる。

【0013】免疫終了後、動物の血液、脾臓、リンパ球又はその他のリンパ球組織よりヒトリンパ球を回収する。まず、Ficoll-Hypaque (比重1.077) 遠心法により単核球を分離し、さらにplastic dish 付着法等で単球を除去する。混入する動物由来細胞の除去は、この動物細胞に特異的な抗血清を用いることにより行なうことができる。この抗血清は、例えば、その動物の脾細胞を抗原として他の動物に免疫し、免疫した動物から血清を分離することにより得ることができる。この抗血清による処理は、リンパ球分離のどの過程で行なっても差し支えない。また、細胞表面に発現しているヒト免疫グロブリンをマーカーにした免疫学的な手法によってもヒトリンパ球を分離することが可能である。上記方法により、所望の抗原に対する主としてIgG抗体及びIgA抗体を産生するヒト由来リンパ球を得ることができる。

【0014】得られた抗体産生ヒト由来リンパ球からヒトモノクローナル抗体を得る場合には、まず、該ヒト由来リンパ球を不死化する。不死化の方法自体は公知であり、例えば、エプスタイン・バーウイルス(EBV)を用いたトランスフォーム法(D. Kozborら、上掲)により、若しくはモノクローナル抗体の作製において常用されている細胞融合法(T. Kudoら、Tohoku J. exp. Med. 154, 345 (1988))により、又はこれらの組合せにより行なうことができる。あるいは、免疫終了後に、免疫不全症動物に直接EBVを接種し、トランスフォームされたヒト由来リンパ球を体内から分離することも可能であり、この態様も請求項1の範囲に含まれるものである。

【0015】不死化細胞からモノクローナル抗体を回収する方法は、モノクローナル抗体の作製において常用されている周知の方法により行なうことができる。すなわち、不死化したリンパ球を限界希釈法等でクローン化し、所望の抗体を産生するものを選択し、それを培地中又は動物の腹腔内で培養して増殖させ、その培養上清又は腹水中から所望のモノクローナル抗体を採取すること

ができる。

【0016】上記した、本発明のモノクローナル抗体の製造方法により、ヒトc-erbB2癌遺伝子産物の細胞外ドメインに対して特異的なモノクローナル抗体が得られた。その詳細は下記実施例3に記載されている。このモノクローナル抗体は、癌、特に胃癌の診断及び治療に用いることができると考えられる。

【0017】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0018】実施例1

KLH(Keyhole lympet hemocyanin) に対するヒトモノクローナル抗体

①リンパ球の移植及び動物の免疫

6週令のC.B-17/Icr-scid マウス(雌)を使用し、1匹当たりヒト末梢血リンパ球を $4 \times 10^7$ 個、腹腔内に移植した。なお、末梢リンパ球の分離はFicoll-Hypaque (比重1.077)遠心法により行った。免疫方法は、0.1mgのKLHを0.2mlのダルベコーリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解後、同量のFreundの完全アジュバントでエマルジョンとし、マウスの腹腔内に投与した。

【0019】なお、2回目以降の免疫にはFreundの不完全アジュバントを使用し、2カ月にわたり計6回の免疫を行った。免疫動物血清中のKLHに対するヒト型IgG値の上昇の様子を図1に示した。なお、図1に示すデータはKLHでコートしたマイクロプレートに免疫マウス血清を加え、反応、水洗後、二次抗体としてパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG及び抗マウスIgG、M、Aを使用したELISA法(OD<sub>492</sub>)により測定した。

【0020】②免疫マウスよりヒトリンパ球の回収とトランスフォーム

免疫終了後、あらかじめ作製しておいた抗血清をマウス腹腔内に投与し、9時間後、開腹し脾臓を摘出した。なお、ここで用いた抗血清は、ウサギ(日本白色種)に抗原としてC.B-17/Icr-scid マウス脾細胞を2週おき計4回静脈内に投与し、免疫終了時に採血、血清分離、33%硫酸塩析して得たものである。脾細胞を分散し(富山朔二・安東民衛/編 単クローン抗体実験マニュアル 講談社サイエンティフィック42(1987))、Ficoll-Hypaque (比重1.077)遠心法によりヒトリンパ球を分離回収した。さらにリンパ球は、EBV トランスフォーム(T. kudo等 Tohoku J. exp. Med., 154, 345(1988))によりトランスフォーム細胞(Bリン芽球様細胞)株を得た。この細胞株の染色体数を測定した結果、図2に示すようにヒト由来の性質を有していた。

【0021】得られたトランスフォーム細胞18株について、それぞれの培養上清液中のKLH特異抗体の分析を行なった。KLHをコートしたマイクロプレートに、

各培養上清液を加え、反応、水洗後、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgA、IgG及びIgMを二次抗体とするELISA法により測定した結果を図3に示した。その結果、トランスフォーム細胞18株は、いずれもKLH特異抗体を産生することが判明した。

【0022】トランスフォーム細胞が、KLH特異抗体を生産することをさらに明確にするため、トランスフォーム細胞の1株(LCL8-9)の培養上清液についてKLHとの吸収反応を行ない、生産抗体がKLH特異であることを示した(図4)。

【0023】③トランスフォーム細胞の細胞融合とモノ\*

\*クローナル抗体の製造

トランスフォーム細胞を親株(SHM-D33)(ATCC CRL-1668)と細胞融合し(T.Kudo等 Tohoku J. exp. Med., 154, 345(1988))、抗KHL抗体産生ハイブリドーマ13株を樹立した。

【0024】これらKLH特異抗体を生産するハイブリドーマ13株について、生産抗体のクラス分析を行なった。その結果を表1に示した。13株の内訳は、IgA 8株、IgG 4株、IgM 1株であった。

10 【0025】

【表1】

表1 KLH特異抗体を生産するハイブリドーマ13株の性質

ハイブリドーマ株番号	抗体のクラス
# 31	IgA
# 64	IgA
# 73	IgA
# 80	IgA
# 84	IgA
# 89	IgA
# 101	IgA
# 149	IgA
# 87	IgG
# 179	IgG
# 191	IgG
# 195	IgG
# 22	IgM

【0026】実施例2

AFP( $\alpha$ -fetoprotein)に対するヒトモノクローナル抗体

①リンパ球の移植及び動物の免疫

6週令のC.B-17/Icr-scid マウス(雌)を使用し、1匹当たりヒト末梢血リンパ球を $5 \times 10^7$ 個、腹腔内に移植した。なお、末梢血リンパ球の分離はFicoll-Hypaque(比重1.077)遠心法により行った。免疫方法は、0.1mgのAFPを0.2mlのダルベコーリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解後、同量のPreundの不完全アジュバントでエマルジョンとし、マウスの腹腔内に投与した。1週及び3週間後にそれぞれ2回目と3回目の免疫を同様の方法で実施した。

【0027】②EBウィルスによるトランスフォーム3回目の免疫終了1週後にB95-8 培養上清液 1mlをマウス腹腔内に投与した。マウスはさらに3週間飼育後屠殺し、末梢血、脾臓、胸腺、腸間膜リンパ節などを摘出した。細胞は10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地に分散し、95%空気-5%炭酸ガス(37℃)環境下で培

養を行った。増殖が認められる細胞をさらに継代培養し、クローニング後トランスフォーム細胞を得た。トランスフォーム細胞培養上清液には、抗AFP抗体(ヒト型IgG、IgAあるいはIgM)が認められた。

【0028】実施例3

c-erbB2癌遺伝子産物に対するヒトモノクローナル抗体

(1)抗原の調製

40 ヒトc-erbB2癌遺伝子産物の細胞外ドメイン部のN末端、No. 495よりNo. 509のペプチド(そのアミノ酸配列は、His Thr Ala Asn Arg ProGlu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu)を合成し、C18-逆相HPLCにより精製を行った。次に、hapten-conjugation kit(PIERCE社製)を使用し、合成ペプチドをKLHと結合させ、抗原とした。

【0029】(2)リンパ球の移植及び動物の免疫

50 8週令のC.B-17/Icr-scid マウス(雌)を使用し、1匹当たりヒト末梢血リンパ球 $5 \times 10^7$ 個を腹腔内に移植した。また、同時に抗原60 $\mu$ gを腹腔内に、50 $\mu$ g

7

を皮下に投与した。さらに1週間の間隔で合計3回腹腔内に抗原を投与した。

【0030】(3)細胞融合とヒトモノクローナル抗体の作製

最終免疫3日後にマウス脾臓を摘出し、溶血剤(0.125%の塩化アンモニウムを含むトリス塩酸バッファ溶液)処理により赤血球を溶血させ、RPMI-1640培地でよく洗浄後、親株(マウスxヒト)ヘテロミエローマ細胞SHM-D33、ATCC CRL-1668)と常法により細胞融合した。オプアルブミンに結合した上記抗原を抗原として用いたELISA法により、融合細胞のスクリーニングを行い、c-erbB2に特異的なヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。このうちの1株TKG41株(微工研菌寄第12816号)の生産するヒトモノクローナル抗体はIgMタイプで、胃癌由来細胞Katol IIIの細胞膜に反応することをセルエライザ法により確認した。

【0031】

【発明の効果】本発明により、所望の抗体を産生するヒト由来リンパ球及び該ヒト由来リンパ球を用いたヒトモノ

8

クローナル抗体の製造方法が提供された。本発明の方法では、免疫を動物に対して行なうので、抗原の種類にかかわらず所望の抗原に対する抗体を工業的に得ることが可能である。また、免疫の期間を長くとれるので、十分に抗体産生を誘起することができる。さらに、本発明の方法によると、生産される抗体が主としてIgG及びIgAであるので、抗体の精製が容易であり、また、得られた抗体が安定である。また、本発明により、ヒトc-erbB2癌遺伝子産物の細胞外ドメインに対して特異的なモノクローナル抗体が提供された。このモノクローナル抗体は癌の診断及び治療に有用である。

【図面の簡単な説明】

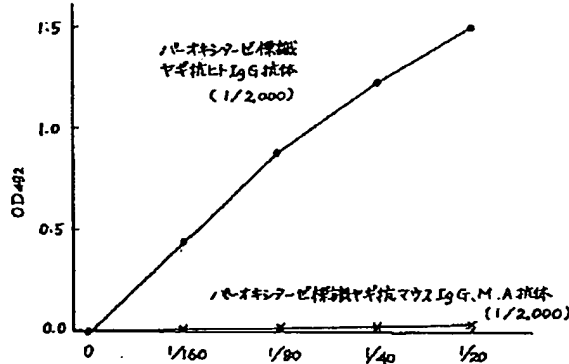
【図1】ヒト末梢血リンパ球を投与した免疫不全症マウスの血清中の抗KLHIgG抗体価を示す図。

【図2】抗体産生リンパ球をEBVでトランスフォームした細胞の染色体数の分布を示す図。

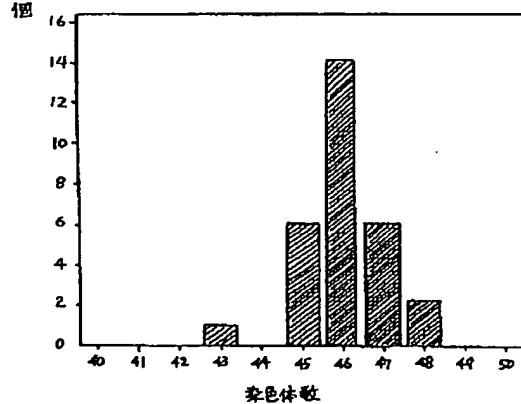
【図3】トランスフォーム細胞培養上清液中のKLH特異抗体の分析結果を示す図。

【図4】トランスフォーム細胞(LCL 8-9株)培養上清液とKLHとの吸収試験の結果を示す図。

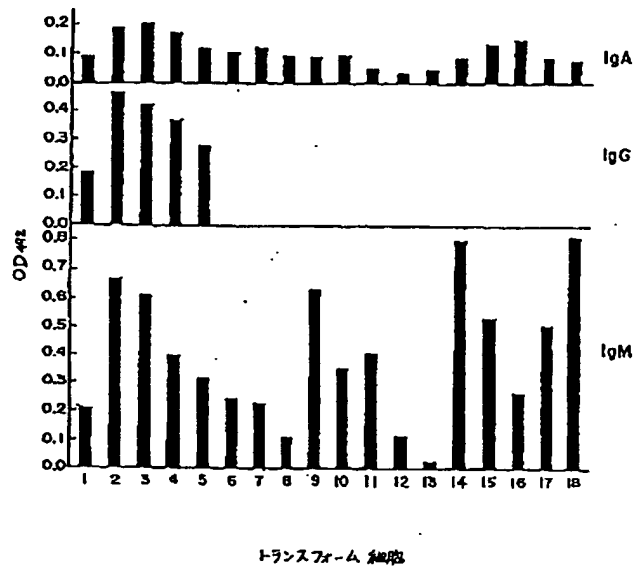
【図1】



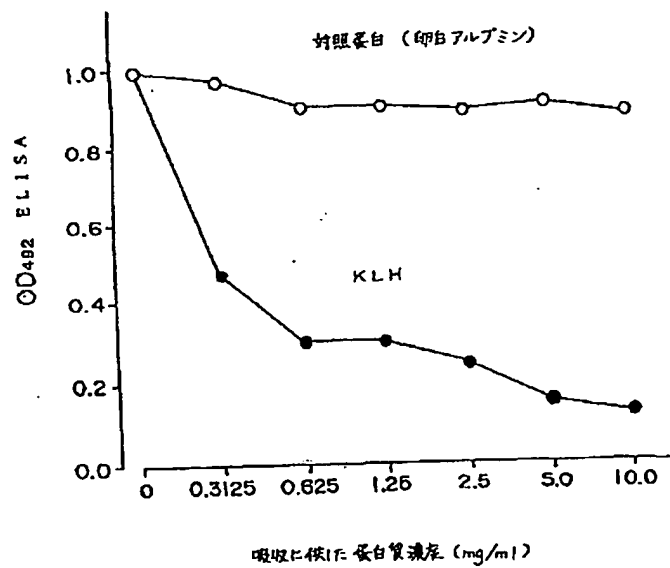
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

// A 6 1 B 10/00

A 6 1 K 39/395

G 0 1 N 33/574

33/577

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

T

T 9284-4C

Z 9015-2 J

B 9015-2 J